

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/13604

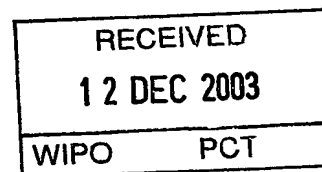
24.10.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 0 月 2 4 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 3 0 9 7 8 5
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 3 0 9 7 8 5]



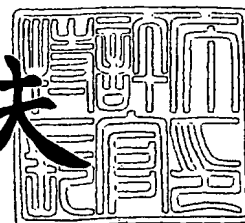
出 願 人 キヤノン株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 1 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 9 7 8 8 9

【書類名】 特許願

【整理番号】 4825011

【提出日】 平成14年10月24日

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 C08G 63/02

【発明の名称】 側鎖にフェニルスルフィニル構造及び／或いはフェニルスルホニル構造を有するユニットを分子中に含む新規なポリヒドロキシアルカノエート共重合体、及びそれらの製造方法

【請求項の数】 17

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社内

【氏名】 矢野 哲哉

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社内

【氏名】 見目 敬

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社内

【氏名】 本間 務

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社内

【氏名】 三原 知恵子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社
内

【氏名】 福井 樹

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号

【氏名又は名称】 キャノン株式会社

【代表者】 御手洗 富士夫

【電話番号】 03-3758-2111

【代理人】

【識別番号】 100090538

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社
内

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 恵三

【電話番号】 03-3758-2111

【選任した代理人】

【識別番号】 100096965

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会
社内

【弁理士】

【氏名又は名称】 内尾 裕一

【電話番号】 03-3758-2111

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011224

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9908388

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 側鎖にフェニルスルフィニル構造及び／或いはフェニルスルホニル構造を有するユニットを分子中に含む新規なポリヒドロキシアлкаノエート共重合体、及びそれらの製造方法

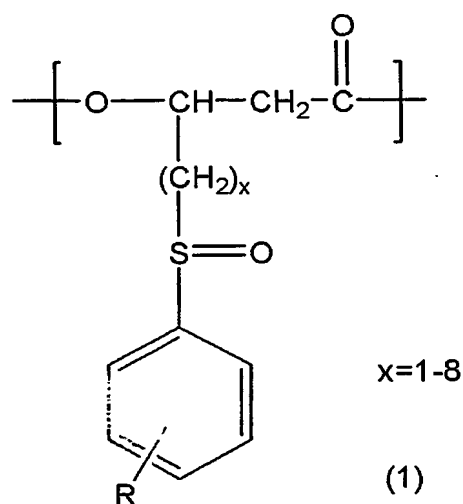
【特許請求の範囲】

【請求項 1】 化学式 (1) に示す 3-ヒドロキシー（置換フェニルスルフィニル）アルカン酸ユニット、あるいは、化学式 (2) に示す 3-ヒドロキシー（置換フェニルスルホニル）アルカン酸ユニットのうち、少なくとも 1 種のユニットをポリマー分子中に含み、

更に、前記分子中に、化学式 (3) に示す 3-ヒドロキシー（置換フェニルスルファニル）アルカン酸ユニットのうち少なくとも 1 種を含んでもよく、

かつ、前記分子中に、化学式 (4) に示すユニット、化学式 (5) に示す 3-ヒドロキシー ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニット、化学式 (6) に示す 3-ヒドロキシー ω -アルケン酸ユニット、或いは、化学式 (7) に示す 3-ヒドロキシー ω -カルボキシアリカン酸ユニットのうち少なくとも 1 種を同時に含むことを特徴とするポリヒドロキシアлкаノエート共重合体。

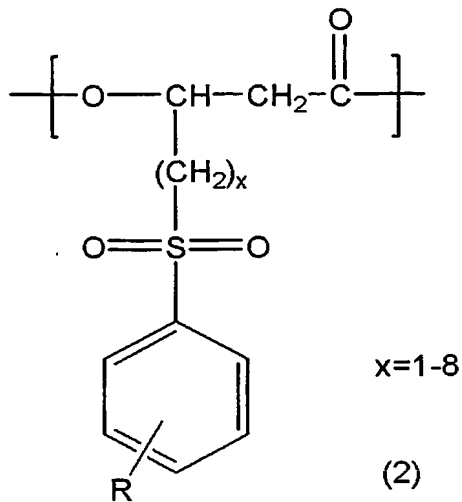
【化 1】



（式中、Rは芳香環への置換基を示し、RはH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR'、SO₂R'（R'：H、Na、K、CH₃、C₂H₅のいずれかを表し、R'：OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC

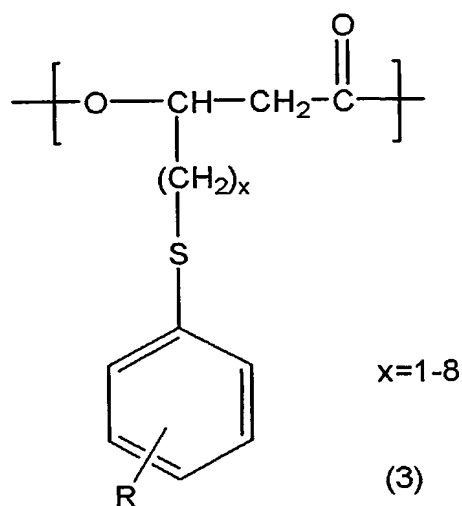
2H5のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい；xは、1～8から選ばれた整数であり、ユニット毎に違う値をとり得る。)

【化2】



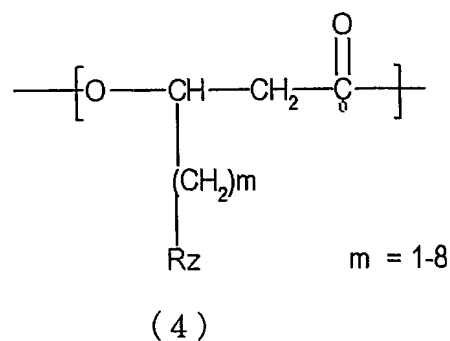
(式中、Rは芳香環への置換基を示し、RはH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR'、SO₂R'' (R' : H、Na、K、CH₃、C₂H₅のいずれかを表し、R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい；xは、1～8から選ばれた整数であり、ユニット毎に違う値をとり得る。)

【化3】



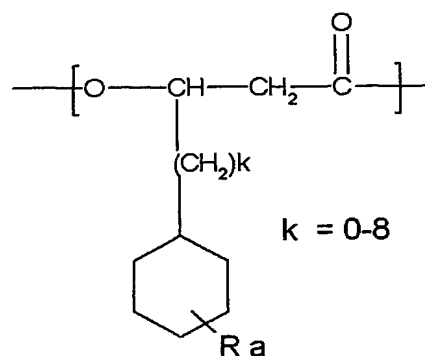
(式中、Rは芳香環への置換基を示し、RはH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR'、SO₂R'' (R' : H、Na、K、CH₃、C₂H₅のいずれかを表し、R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい；xは、1～8から選ばれた整数であり、ユニット毎に違う値をとり得る。)

【化4】



(mは化学式中に示した範囲内から選ばれた整数である；R_zはフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる；複数のユニットが存在する場合、mおよびR_zは、ユニット毎に異なってもよい。)

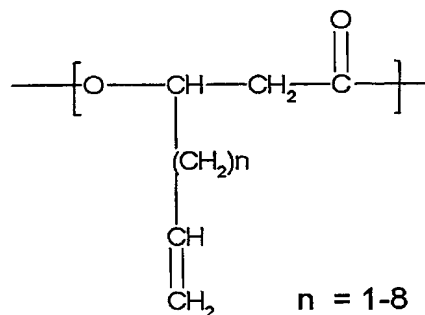
【化5】



(5)

(式中、 R_a はシクロヘキシル基への置換基を示し、 R_a はH原子、CN基、NO₂基、ハロゲン原子、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基またはC₃F₇基であり、 k は化学式中に示した範囲から選ばれた整数であり、複数のユニットが存在する場合、 R_a 及び k は、ユニット毎に異なってもよい。)

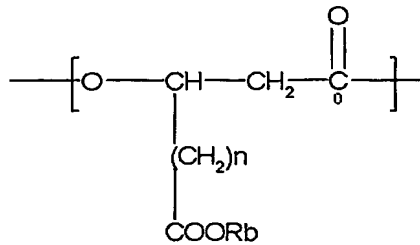
【化6】



(6)

(n は化学式中に示した範囲内から選ばれた整数であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【化 7】



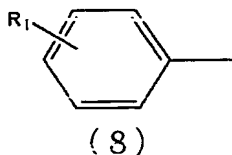
$$n = 1-8$$

(7)

(n は化学式中に示した範囲内から選ばれた整数である；R_b は、H 原子、Na 原子または K 原子である；複数のユニットが存在する場合、n および R_b は、ユニット毎に異なってもよい。)

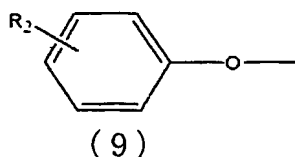
【請求項 2】 化学式 (4) における R_z、即ちフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基が、化学式 (8)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15) のいずれかであり、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す、請求項 1 に記載のポリヒドロキシアルカノエート共重合体。

【化 8】



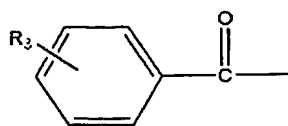
(式中、R₁ は芳香環への置換基を示し、R₁ は H 原子、ハロゲン原子、CN 基、NO₂ 基、COOR' (R' : H、Na、K のいずれかを表す)、CH₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基、CH=CH₂ 基、CF₃ 基、C₂F₅ 基または C₃F₇ 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【化 9】



(式中、 R_2 は芳香環への置換基を示し、 R_2 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 SCH_3 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

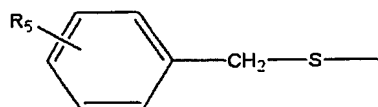
【化10】



(10)

(式中、 R_3 は芳香環への置換基を示し、 R_3 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

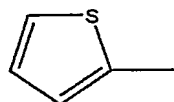
【化11】



(11)

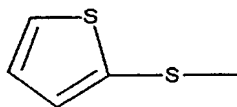
(式中、 R_5 は芳香環への置換基を示し、 R_5 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR'$ 、 SO_2R'' (R' : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2CH$ 基または $(CH_3)_3C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【化12】



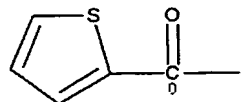
(12)

【化13】



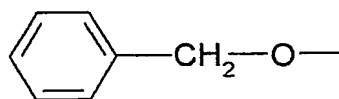
(13)

【化14】



(14)

【化15】



(15)

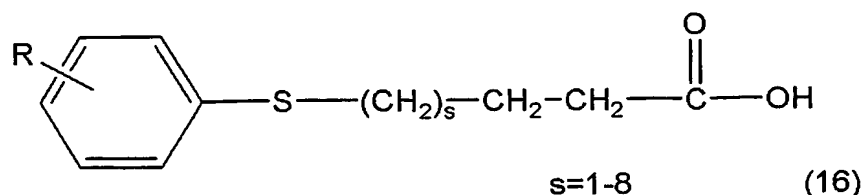
【請求項3】 数平均分子量が1000から1000000の範囲である請求項1または2記載のポリヒドロキシアリカノエート共重合体。

【請求項4】 化学式(16)で示す ω -（置換フェニルスルファニル）アルカン酸の少なくとも1種、及び、化学式(17)で示す化合物の少なくとも1種、化学式(18)で示す ω -シクロヘキシルアルカン酸の少なくとも1種、もしくは、化学式(19)で示す ω -アルケン酸の少なくとも1種、を原料として、

化学式(3)に示す3-ヒドロキシー（置換フェニルスルファニル）アルカン酸ユニットを少なくとも分子中に含み、かつ、化学式(20)に示すユニット、化学式(5)に示す3-ヒドロキシー ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニット、もしくは、化学式(6)に示す3-ヒドロキシー ω -アルケン酸ユニットの少なくとも1種を前記分子中に同時に含むポリヒドロキシアリカノエート共重合体を生産する能力を有する微生物により生合成せしめることを特徴とする、化学式(3)に示す3-ヒドロキシー（置換フェニルスルファニル）アルカン酸ユニットを少なくとも分子中に含み、かつ、化学式(20)に示すユニット、化学式(5)

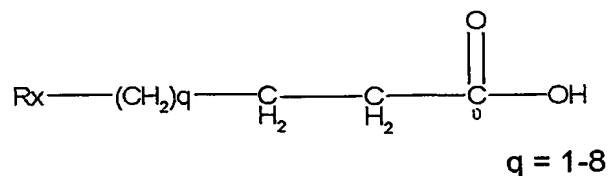
) に示す 3-ヒドロキシ- ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニット、もしくは、化学式 (6) に示す 3-ヒドロキシ- ω -アルケン酸ユニットの少なくとも 1 種を分子中に同時に含むポリヒドロキシルアルカノエート共重合体の製造方法。

【化 16】



(式中、R は芳香環への置換基を示し、R は H 原子、ハロゲン原子、CN 基、NO₂ 基、COOR'、SO₂R'' (R' : H、Na、K、CH₃、C₂H₅ のいずれかを表し、R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅ のいずれかを表す)、CH₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基、(CH₃)₂-CH 基または (CH₃)₃-C 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい；また、s は、1~8 から選ばれた整数であり、ユニット毎に違う値をとり得る。)

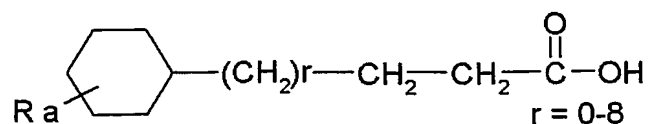
【化 17】



(17)

(q は化学式中に示した範囲内から選ばれた整数である；R_x はフェニル構造、或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)

【化 18】

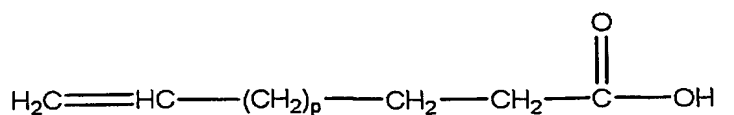


(18)

(式中、R_a はシクロヘキシル基への置換基を示し、R_a は H 原子、CN 基、N

O₂基、ハロゲン原子、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基またはC₃F₇基であり、rは化学式中に示した範囲内から選ばれた整数である)

【化19】

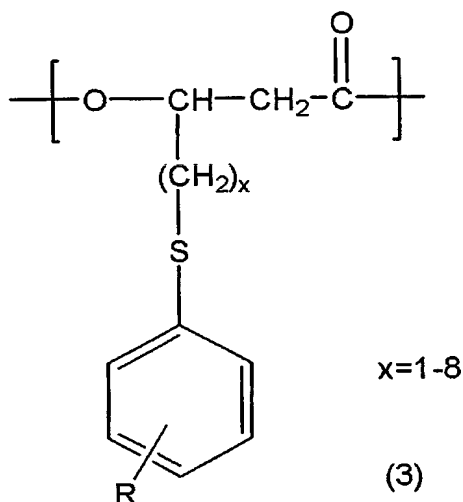


$$p = 1-8$$

(19)

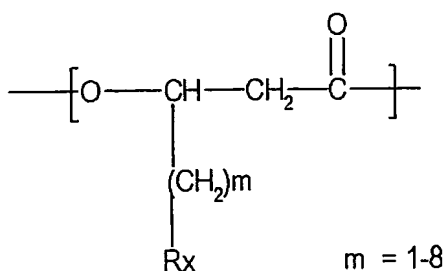
(pは化学式中に示した範囲内から選ばれた整数である)

【化20】



(式中、Rは芳香環への置換基を示し、RはH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR'、SO₂R'' (R' : H、Na、K、CH₃、C₂H₅のいずれかを表し、R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい；xは、1～8から選ばれた整数であり、ユニット毎に違う値をとり得る。)

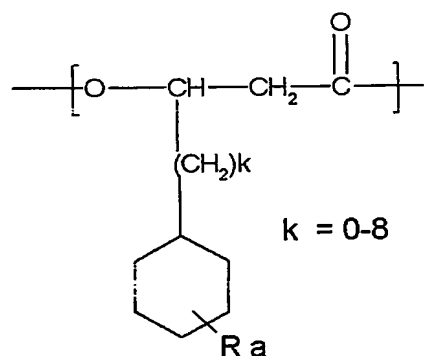
【化 2 1】



(20)

(mは化学式中に示した範囲内から選ばれた整数である；R_xはフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる；複数のユニットが存在する場合、mおよびR_xは、ユニット毎に異なってもよい。)

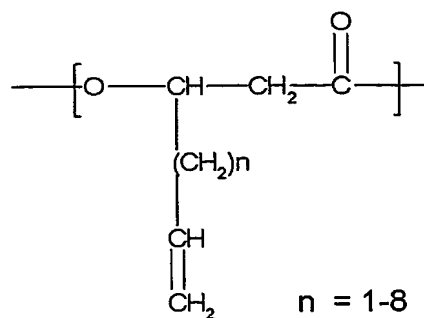
【化 2 2】



(5)

(式中、R_aはシクロヘキシル基への置換基を示し、R_aはH原子、CN基、NO₂基、ハロゲン原子、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基またはC₃F₇基であり、kは化学式中に示した範囲から選ばれた整数であり、複数のユニットが存在する場合、R_a及びkは、ユニット毎に異なってもよい。)

【化 2 3】



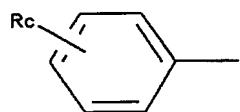
(6)

(n は化学式中に示した範囲内から選ばれた整数であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【請求項 5】 化学式 (20) 及び (17) における R_x 、即ちフェニル構造、チエニル構造を有する残基が、化学式 (21)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15) のいずれかで示される残基の少なくとも 1 種であって、

化学式 (20) で示されるユニットが複数存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す、請求項 4 記載のポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法。

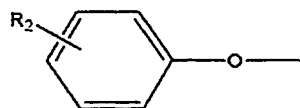
【化 2 4】



(21)

(式中、 R_c は芳香環への置換基を示し、 R_c は H 原子、ハロゲン原子、CN 基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $\text{CH}=\text{CH}_2$ 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

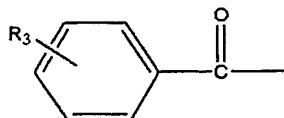
【化 2 5】



(9)

(式中、 R_2 は芳香環への置換基を示し、 R_2 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 SCH_3 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

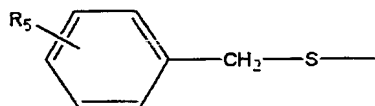
【化26】



(10)

(式中、 R_3 は芳香環への置換基を示し、 R_3 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

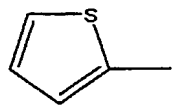
【化27】



(11)

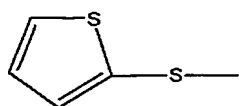
(式中、 R_5 は芳香環への置換基を示し、 R_5 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR'$ 、 SO_2R'' (R' : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2CH$ 基または $(CH_3)_3C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【化28】



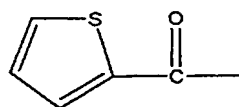
(12)

【化 29】



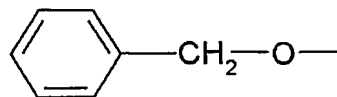
(13)

【化 30】



(14)

【化 31】



(15)

【請求項 6】 前記化学式 (16) で示す ω -（置換フェニルスルファニル）アルカン酸の少なくとも 1 種を含み、かつ、化学式 (17) で示す化合物の少なくとも 1 種、もしくは化学式 (18) で示す ω -シクロヘキシルアルカン酸の少なくとも 1 種、もしくは化学式 (19) で示す ω -アルケン酸の少なくとも 1 種とを含む培地中で前記微生物を培養する、請求項 4 または 5 記載のポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法。

【請求項 7】 前記化学式 (16) で示す ω -（置換フェニルスルファニル）アルカン酸の少なくとも 1 種を含み、かつ、化学式 (17) で示す化合物の少なくとも 1 種、もしくは化学式 (18) で示す ω -シクロヘキシルアルカン酸の少なくとも 1 種、もしくは化学式 (19) で示す ω -アルケン酸の少なくとも 1 種に加えて、ペプチド類、酵母エキス、有機酸或いはその塩、アミノ酸或いはその塩、糖類、炭素数 4 から 12 の直鎖アルカン酸或いはその塩のうちの少なくとも 1 種を含む培地中で、前記微生物を培養する請求項 6 記載のポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法。

【請求項 8】 前記微生物の培養において、培地中に含有されるペプチド類がポリペプトンであり、また、培地中に含有される有機酸或いはその塩が、ピルビン酸、オキサロ酢酸、クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、コハク酸、

フマル酸、リンゴ酸、乳酸、あるいはこれらの塩からなる群より選択される1つ以上の化合物であり、また、培地中に含有されるアミノ酸或いはその塩が、グルタミン酸、アスパラギン酸、或いはこれらの塩からなる群より選択される1つ以上の化合物であり、また、培地中に含有される糖類として、グリセロアルデヒド、エリトロース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、グリセロール、エリトリール、キシリトリール、グルコン酸、グルクロン酸、ガラクトン酸、マルトース、スクロース、ラクトースからなる群より選択される1つ以上の化合物である請求項7記載のポリヒドロキシアлкаノエート共重合体の製造方法。

【請求項9】 前記化学式(16)で示す ω -（置換フェニルスルファニル）アルカン酸の少なくとも1種を含み、かつ、化学式(17)で示す化合物の少なくとも1種、もしくは化学式(18)で示す ω -シクロヘキシルアルカン酸の少なくとも1種、もしくは化学式(19)で示す ω -アルケン酸の少なくとも1種とを含む培地中で前記微生物を培養し、前記微生物が産生した前記化学式(3)に示す3-ヒドロキシー（置換フェニルスルファニル）アルカン酸ユニットを少なくとも分子中に含み、かつ、化学式(20)に示すユニットもしくは化学式(5)に示す3-ヒドロキシー ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニットもしくは化学式(6)に示す3-ヒドロキシー ω -アルケン酸ユニットとを少なくとも分子中に同時に含むポリヒドロキシアлкаノエート共重合体を微生物細胞から回収する工程を有する請求項4乃至8のいずれかに記載のポリヒドロキシアлкаノエート共重合体の製造方法。

【請求項10】 前記微生物として、シュドモナス（*Pseudomonas*）属に属する微生物を用いることを特徴とする請求項4乃至9のいずれかに記載のポリヒドロキシアлкаノエート共重合体の製造方法。

【請求項11】 前記微生物として、シュドモナス・チコリアイ YN2株（*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM BP-7375）、シュドモナス・チコリアイ H45株（*Pseudomonas cichorii* H45; FERM BP-7374）、シュドモナス・ジェッセニイ P161株（*Pseudomonas jessenii* P16

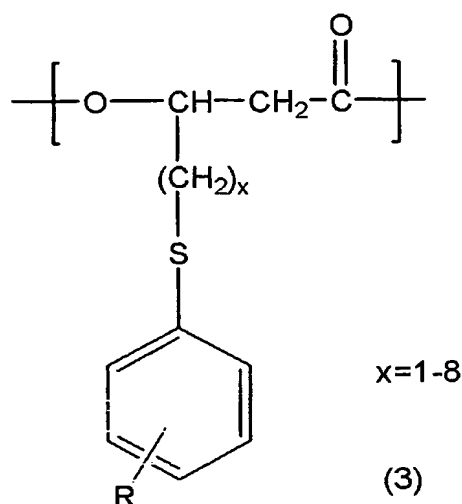
1 ; F E R M B P - 7 3 7 6) のいずれか 1 つ以上の株を用いる請求項 1 0 記載のポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法。

【請求項 1 2】 化学式 (3) に示す 3 - ヒドロキシー (置換フェニルスルファニル) アルカン酸ユニットを少なくとも分子中に含み、かつ、化学式 (2 0) に示すユニット、化学式 (5) に示す 3 - ヒドロキシー ω - シクロヘキシルアルカン酸ユニット、もしくは、化学式 (6) に示す 3 - ヒドロキシー ω - アルケン酸ユニットのうち少なくとも 1 種を分子中に同時に含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体を原料として、

少なくとも化学式 (3) に示す 3 - ヒドロキシー (置換フェニルスルファニル) アルカン酸ユニットの酸化、かつ、原料のユニット組成に依存して化学式 (2 0) に示すユニットもしくは化学式 (6) に示す 3 - ヒドロキシー ω - アルケン酸ユニットの酸化が同時になされることにより、

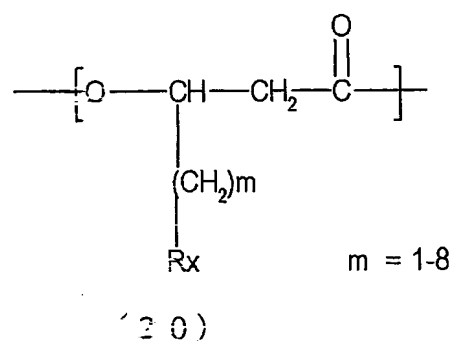
化学式 (1) に示す 3 - ヒドロキシー (置換フェニルスルフィニル) アルカン酸ユニット、あるいは、化学式 (2) に示す 3 - ヒドロキシー (置換フェニルスルホニル) アルカン酸ユニットのうち、少なくとも 1 種のユニットをポリマー分子中に含み、更に、化学式 (3) に示す 3 - ヒドロキシー (置換フェニルスルファニル) アルカン酸ユニットの少なくとも 1 種をポリマー分子中に含んでもよく、かつ、化学式 (4) に示すユニットもしくは化学式 (5) に示す 3 - ヒドロキシー ω - シクロヘキシルアルカン酸ユニットもしくは化学式 (6) に示す 3 - ヒドロキシー ω - アルケン酸ユニットもしくは化学式 (7) に示す 3 - ヒドロキシー ω - カルボキシアルカン酸ユニットとを少なくとも分子中に同時に含むことを特徴とするポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法。

【化 3 2】



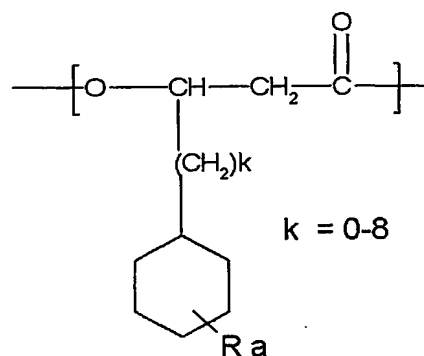
(式中、Rは芳香環への置換基を示し、RはH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR'、SO₂R'' (R' : H、Na、K、CH₃、C₂H₅のいずれかを表し、R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい；xは、1～8から選ばれた整数であり、ユニット毎に違う値をとり得る。)

【化 3 3】



(mは化学式中に示した範囲内から選ばれた整数である；R_xはフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる；複数のユニットが存在する場合、mおよびR_xは、ユニット毎に異なってもよい。)

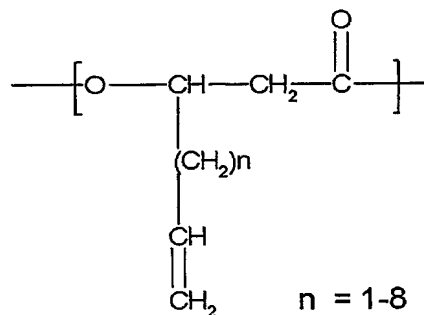
【化 3 4】



(5)

(式中、 R_a はシクロヘキシル基への置換基を示し、 R_a は H 原子、CN 基、 NO_2 基、ハロゲン原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、 k は化学式中に示した範囲から選ばれた整数であり、複数のユニットが存在する場合、 R_a 及び k は、ユニット毎に異なってもよい。)

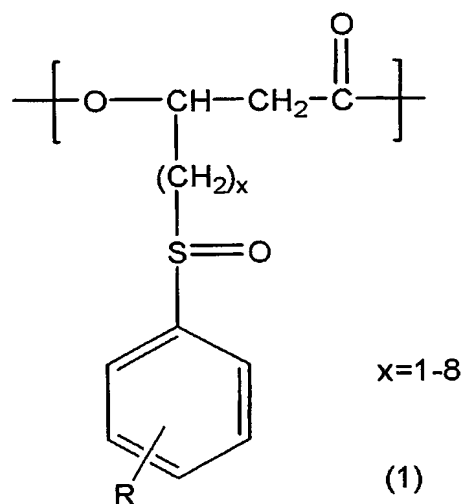
【化 3 5】



(6)

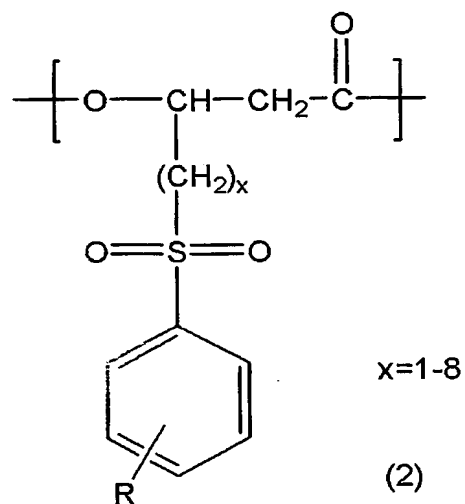
(n は化学式中に示した範囲内から選ばれた整数であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【化 3 6】



(式中、Rは芳香環への置換基を示し、RはH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR'、SO₂R'' (R' : H、Na、K、CH₃、C₂H₅のいずれかを表し、R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい；xは、1～8から選ばれた整数であり、ユニット毎に違う値をとり得る。)

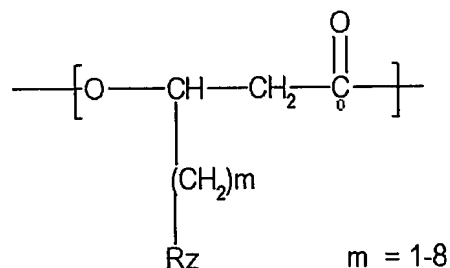
【化 3 7】



(式中、Rは芳香環への置換基を示し、RはH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR'、SO₂R'' (R' : H、Na、K、CH₃、C₂H₅の

いずれかを表し、 R' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい； x は、1～8 から選ばれた整数であり、ユニット毎に違う値をとり得る。)

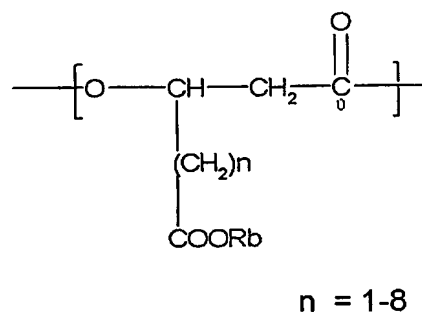
【化 3 8】



(4)

(m は化学式中に示した範囲内から選ばれた整数である； R_z はフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる；複数のユニットが存在する場合、 m および R_z は、ユニット毎に異なってもよい。)

【化 3 9】



(7)

(n は化学式中に示した範囲内から選ばれた整数である； R_b は、H 原子、Na 原子または K 原子である；複数のユニットが存在する場合、 n および R_b は、ユニット毎に異なってもよい。)

【請求項 13】 前記、化学式 (3) に示す 3-ヒドロキシー（置換フェニルスルファニル）アルカン酸ユニットを少なくとも分子中に含み、かつ、化学式 (20) に示すユニットもしくは化学式 (5) に示す 3-ヒドロキシー ω -シク

ロヘキシルアルカン酸ユニットもしくは化学式(6)に示す3-ヒドロキシ- ω -アルケン酸ユニットとを少なくとも分子中に同時に含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体が、請求項4~11のいずれかに記載の方法で製造されたことを特徴とする、請求項12記載のポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法。

【請求項14】 該酸化方法として、過マンガン酸塩、重クロム酸塩、過ヨウ素酸塩、過酸化水素、過炭酸ナトリウム、メタクロロ過安息香酸、過蟻酸、過酢酸からなる群より選択される一つ以上の選ばれる酸化剤を用いて、酸化処理を行う請求項12または13記載の製造方法。

【請求項15】 該酸化方法として、酸化剤として過マンガン酸塩を用いて、酸性条件下で酸化処理を行う請求項14記載の製造方法。

【請求項16】 該酸化方法として、オゾンを用いる請求項12または13記載の製造方法。

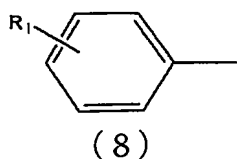
【請求項17】 化学式(4)における R_z 、即ちフェニル構造、チエニル構造を有する残基が、

化学式(8)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)のいずれかで示される残基の少なくとも1種であり、

更には、化学式(17)及び(20)における R_x 、即ちフェニル構造、チエニル構造を有する残基が、

化学式(21)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)のいずれかで示される残基の少なくとも1種であることを特徴とする、請求項12乃至16のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法。

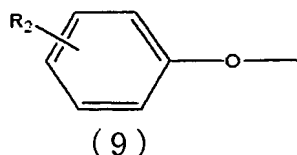
【化40】



(式中、 R_1 は芳香環への置換基を示し、 R_1 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR'$ (R' : H、Na、Kのいずれかを表す)、 CH_3 基、

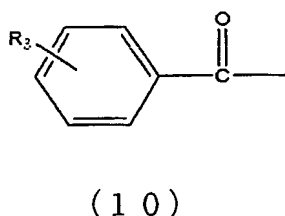
C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $CH=CH_2$ 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【化41】



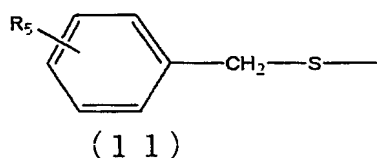
(式中、 R_2 は芳香環への置換基を示し、 R_2 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 SCH_3 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【化42】



(式中、 R_3 は芳香環への置換基を示し、 R_3 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

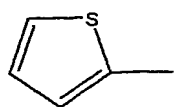
【化43】



(式中、 R_5 は芳香環への置換基を示し、 R_5 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR'$ 、 SO_2R'' (R' : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合

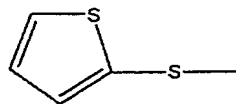
、ユニット毎に異なってもよい。)

【化 4 4】



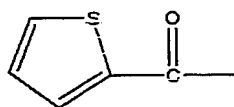
(12)

【化 4 5】



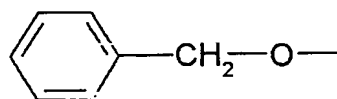
(13)

【化 4 6】



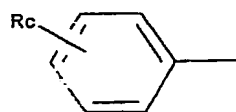
(14)

【化 4 7】



(15)

【化 4 8】



(21)

(式中、 R_c は芳香環への置換基を示し、 R_c はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $CH=CH_2$ 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なユニットを含むポリヒドロキシアリカノエート共重合体と、微生物を利用するその製造方法に関する。

【0002】

【背景技術】

これまで、多くの微生物がポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) あるいはその他のPHAを生産し、菌体内に蓄積することが報告されてきた(非特許文献1参照)。これらのポリマーは従来のプラスチックと同様に、熔融加工等により各種製品の生産に利用することができる。更に、生分解性であるがゆえに、自然界で微生物により完全分解されるという利を有しており、従来の多くの合成高分子化合物のように自然環境に残留して汚染を引き起こすことがない。また、生体適合性にも優れており、医療用軟質部材等としての応用も期待されている。

【0003】

このような微生物産生PHAは、その生産に用いる微生物の種類や培地組成、培養条件等により、様々な組成や構造のものとなり得ることが知られており、これまで主に、PHAの物性の改良という観点から、このような組成や構造の制御に関する研究がなされてきた。

【0004】

[1] まず、3-ヒドロキシ酪酸(以下、3HBと略す)をはじめとする比較的簡単な構造のモノマーユニットを重合させたPHAの生合成としては、次のものが挙げられる。

【0005】

(a) 3HBと3-ヒドロキシ吉草酸(以下3HV)を含むもの(特許文献1、特許文献2、特許文献3、特許文献4参照)

(b) 3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸(以下3HHx)を含むもの(特許文献5、特許文献6参照)

(c) 3HBと4-ヒドロキシ酪酸(以下4HB)を含むもの(特許文献7参照)

(d) 炭素数6から12までの3-ヒドロキシアリカノエートを含むもの(特許文献8参照)

(e) 単一の脂肪酸を炭素源とした生合成。生産物は (d) とほぼ同様 (非特許文献 2 参照)

等が挙げられる。これらはいずれも微生物による炭化水素等の β 酸化や糖からの脂肪酸合成により合成された、いずれも側鎖にアルキル基を有するモノマーユニットからなる PHA、即ち、「usual PHA」である。

【0006】

[2] しかし、このような微生物産生 PHA のより広範囲な応用、例えば機能性ポリマーとしての応用を考慮した場合、アルキル基以外の置換基を側鎖に導入した PHA 「unusual PHA」が極めて有用であることが期待される。置換基の例としては、芳香環を含むもの (フェニル基、フェノキシ基、など) や、不飽和炭化水素、エステル基、アリル基、シアノ基、ハロゲン化炭化水素、エポキシドなどが挙げられる。これらの中でも、特に、芳香環を有する PHA の研究が盛んになされている。

【0007】

(a) フェニル基もしくはその部分置換体を含むもの

5-フェニル吉草酸を基質として、シュードモナス オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が 3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸をユニットとして含む PHA を生産することが報告されている (非特許文献 3、非特許文献 4 参照)。

【0008】

また、5-(4'-トリル) 吉草酸を基質として、シュードモナス オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が 3-ヒドロキシ-5-(4'-トリル) 吉草酸をユニットとして含む PHA を生産することが報告されている (非特許文献 5 参照)。

【0009】

また、5-(2', 4'-ジニトロフェニル) 吉草酸を基質として、シュードモナス オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が 3-ヒドロキシ-5-(2', 4'-ジニトロフェニル) 吉草酸及び 3-ヒドロキシ-5-(4'-ニトロフェニル) 吉草酸をユニットとして含む PHA を生産

することが報告されている（非特許文献6参照）。

【0010】

(b) フェノキシ基もしくはその部分置換体を含むもの

11-フェノキシウンデカン酸を基質として、シュードモナス オレオボランズ (*Pseudomonas oleovorans*) が3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸と3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸のPHAコポリマーを生産することが報告されている（非特許文献7参照）。

【0011】

3-ヒドロキシ、5-（モノフルオロフェノキシ）ペンタノエート（3H5（MFP）P）ユニットあるいは3-ヒドロキシ、5-（ジフルオロフェノキシ）ペンタノエート（3H5（DFP）P）ユニットからなるホモポリマー、少なくとも3H5（MFP）Pユニットあるいは3H5（DFP）Pユニットを含有するコポリマー；これらのポリマーを合成するシュードモナス・プチダ；シュードモナス属を用いた前記のポリマーの製造法に関する発明が開示されており、その効果として、置換基をもつ長鎖脂肪酸を資化して、側鎖末端が1から2個のフッ素原子が置換したフェノキシ基をもつポリマーを合成することができ、融点が高く良い加工性を保持しながら、立体規則性、撥水性を与えることができるとしている（特許文献9参照）。

【0012】

この様なフッ素基置換体以外に、シアノ基やニトロ基の置換体の研究もなされている。

【0013】

シュードモナス オレオボランズ (*Pseudomonas oleovorans*) ATCC 29347株及びシュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) KT 2442株を用いて、オクタン酸とp-シアノフェノキシヘキサン酸或いはp-ニトロフェノキシヘキサン酸を基質として、3-ヒドロキシ-p-シアノフェノキシヘキサン酸或いは3-ヒドロキシ-p-ニトロフェノキシヘキサン酸をモノマーユニットとして含むPHAの生産が報告されている（非特許文献8、非特許文献9参照）。

【0014】

これらの報告は側鎖がアルキル基である一般的なPHAとは異なり、いずれもPHAの側鎖に芳香環を有しており、それに由来する物性を有するポリマーを得る上で有益である。

【0015】

[3] また新たなカテゴリーとして、単に物性の変化に留まらず、側鎖に適当な官能基を有するPHAを生産し、その官能基を利用して新たな機能を生み出そうとする研究も行なわれている。例えば、ユニット中にブロモ基やビニル基のような付加反応などにおける反応性が高い活性基を有するPHAを生産し、活性基を利用した化学変換により任意の官能基をポリマー側鎖に導入し、多機能のPHAを得ることを目的とした研究が挙げられる。

【0016】

高い反応性が期待されるチオエーテル（-S-；スルファニル結合）を持つユニットを含むPHAの合成例として、シュードモナス プチダ（*Pseudomonas putida*）27N01株が11-チオフェノキシウンデカン酸（11-（フェニルスルファニル）ウンデカン酸）を基質とし、3-ヒドロキシー5-チオフェノキシ吉草酸（3-ヒドロキシー5-（フェニルスルファニル）吉草酸）及び3-ヒドロキシー7-チオフェノキシヘプタン酸（3-ヒドロキシー7-（フェニルスルファニル）ヘプタン酸）のPHAコポリマーを生産することが報告されている（非特許文献10参照）。

【0017】

また、シュードモナス オレオボランス（*Pseudomonas oleovorans*）を用いて、側鎖にブロモ基を有するPHAを生産し、アセチル化マルトースのチオール化物を側鎖に修飾し、その溶解性や親水性の異なるPHAを合成したことが報告されている（非特許文献11参照）。

【0018】

また、10-ウンデセン酸を基質として、側鎖末端に不飽和結合を有する3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含むPHAを生産した後、過マンガン酸カリウムを用いた酸化反応により合成した側鎖末端にジオールを有する

3-ヒドロキシアルカン酸が、メタノール、アセトン-水（80/20, v/v）混合溶媒、ジメチルスルホキシド等の極性溶媒に可溶化し、クロロホルム、テトラヒドロフラン、アセトン等の非極性溶媒に不溶化するといった、溶媒への溶解性が変化したことが報告されている（非特許文献12参照）。

【0019】

また、シュードモナス・オレオボランス（*Pseudomonas oleovorans*）を用いて側鎖にビニル基を有するポリエステルを生産し、ビニル基をエポキシ化することにより、エポキシ基を側鎖に有するポリエステルを生産したことが報告されている（非特許文献13参照）。

【0020】

また、ポリエステル側鎖のビニル基を利用し、ポリエステル分子内の架橋反応を行い、ポリエステルの物性を改良したことが報告されている（非特許文献14参照）。

【0021】

また、10-ウンデセン酸を基質として、3-ヒドロキシ-10-ウンデセン酸をモノマーユニットとして含むPHAを生産した後、過マンガン酸カリウムを用いた酸化開裂反応により合成した3-ヒドロキシ-10-カルボキシデカン酸をモノマーユニットとして含むPHAについて、その分解速度の向上が認められたことが報告されている（非特許文献15参照）。

【0022】

一方、ユニット中に活性基を有するPHAの物性を変化させ、ポリマーとして実際に利用していくために、活性基を有するユニット以外のユニットを含むPHA共重合体を微生物合成することが検討されており、シュードモナス・オレオボランス（*Pseudomonas oleovorans*）を用いて、11-ブロモウンデカン酸、8-ブロモオクタン酸、6-ブロモヘキサン酸といった ω -ブロモアルカン酸とn-ノナン酸の共存下で3-ヒドロキシ- ω -ブロモアルカン酸ユニットと直鎖アルカン酸ユニットを含むPHA共重合体を生産した例が報告されている（非特許文献16参照）。

【0023】

このように、ユニット中にプロモ基やビニル基のような反応性が高い活性基を有するPHAでは、様々な官能基の導入や、化学的変換を施すことが可能であり、また、ポリマーの架橋点ともなり得るため、活性基を有するPHAは、PHAの多機能化を図る上で非常に有効な方法であると言える。

【0024】

【特許文献1】

特公平6-15604号公報、

【特許文献2】

特公平7-14352号公報、

【特許文献3】

特公平8-19227号公報

【特許文献4】

特開平5-7492号公報

【特許文献5】

特開平5-93049号公報

【特許文献6】

特開平7-265065号公報

【特許文献7】

特開平9-191893号公報

【特許文献8】

特許公報第2642937号

【特許文献9】

特許公報第2989175号

【非特許文献1】

生分解性プラスチック研究会編「生分解性プラスチックハンドブック」(株)エヌ・ティー・エス、1995年、p. 178-197

【非特許文献2】

Appl. Environ. Microbiol, 58号(2), 1992年、p. 746

【非特許文献3】

Makromol. Chem., 191号, 1990年、p. 1957-1965

【非特許文献4】

Macromolecules, 24号, 1991年、p. 5256-5260

【非特許文献5】

Macromolecules, 29号, 1996年、p. 1762-1766

【非特許文献6】

Macromolecules, 32号, 1999年、p. 2889-2895

【非特許文献7】

Makromol. Chem. Phys., 195号, 1994年、p. 1665-1672

【非特許文献8】

Can. J. Microbiol., 41号, 1995年、p. 32-43

【非特許文献9】

Polymer International, 39号, 1996年、p. 205-213

【非特許文献10】

Macromolecules, 32号, 1999年、p. 8315-8318

【非特許文献11】

Makromol. Rapid Commun., 20号, 1999年、p. 91-94

【非特許文献12】

Polymer, 41号, 2000年、p. 1703-1709

【非特許文献13】

Macromolecules, 31号, 1998年, p. 1480-1486

【非特許文献14】

Polymer, 35号, 1994年, p. 2090-2097

【非特許文献15】

Macromolecular chemistry, 4号, 2001年, p. 289-293

【非特許文献16】

Macromolecules, 25号, 1992年, p. 1852-1857

【0025】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、PHAのモノマーユニット比を任意に制御でき、更にポリマーとしての応用が制限されないように物性、特には熱的特性、溶媒への溶解性を任意に制御し得るようなPHA及びその製造方法を提供する。

【0026】

【課題を解決するための手段ならびに実施の形態】

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究した結果、以下のような発明に至った。

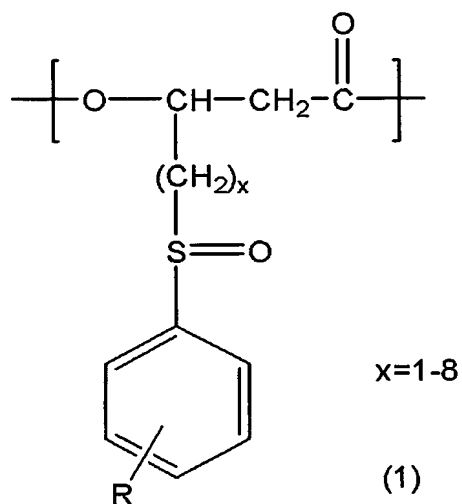
【0027】

即ち、本発明は、化学式(1)に示す3-ヒドロキシー(置換フェニルスルフィニル)アルカン酸ユニット、あるいは、化学式(2)に示す3-ヒドロキシー(置換フェニルスルホニル)アルカン酸ユニットのうち、少なくとも1種のユニットをポリマー分子中に含み、更に、前記分子中に、化学式(3)に示す3-ヒドロキシー(置換フェニルスルファニル)アルカン酸ユニットのうち少なくとも1種を含んでもよく、かつ、前記分子中に、化学式(4)に示すユニット、化学式(5)に示す3-ヒドロキシー ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニット、化学式(6)に示す3-ヒドロキシー ω -アルケン酸ユニット、或いは、化学式(7)に示す3-ヒドロキシー ω -カルボキシルアルカン酸ユニットのうち少なくとも

1種を同時に含むことを特徴とするポリヒドロキシアルカノエート共重合体である。

【0028】

【化49】

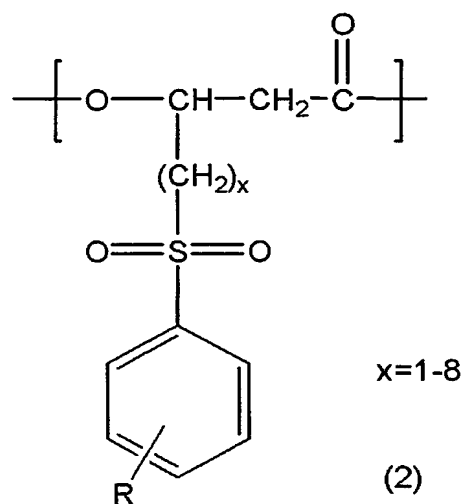


【0029】

(式中、Rは芳香環への置換基を示し、RはH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR'、SO₂R'' (R' : H、Na、K、CH₃、C₂H₅のいずれかを表し、R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい；xは、1～8から選ばれた整数であり、ユニット毎に違う値をとり得る。)

【0030】

【化50】

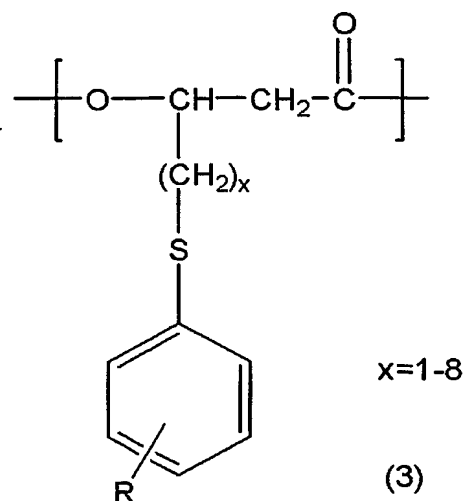


【0031】

(式中、Rは芳香環への置換基を示し、RはH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR'、SO₂R'' (R' : H、Na、K、CH₃、C₂H₅のいずれかを表し、R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい；xは、1～8から選ばれた整数であり、ユニット毎に違う値をとり得る。)

【0032】

【化51】

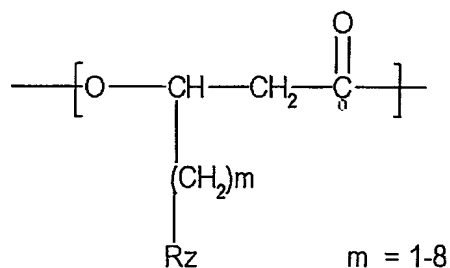


【0033】

(式中、Rは芳香環への置換基を示し、RはH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR'、SO₂R'' (R': H、Na、K、CH₃、C₂H₅のいずれかを表し、R'': OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい；xは、1～8から選ばれた整数であり、ユニット毎に違う値をとり得る。)

【0034】

【化52】

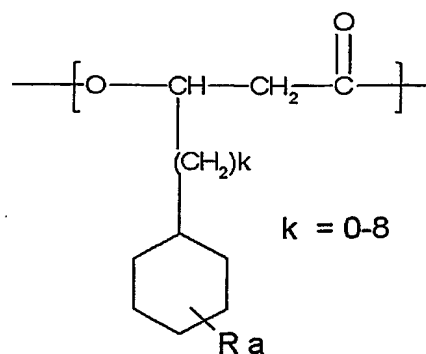


(4)

(mは化学式中に示した範囲内から選ばれた整数である；R_zはフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる；複数のユニットが存在する場合、mおよびR_zは、ユニット毎に異なってもよい。)

【0035】

【化53】

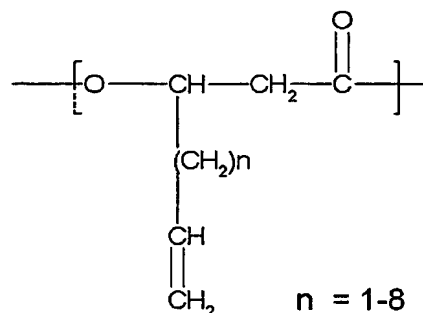


(5)

(式中、 R_a はシクロヘキシル基への置換基を示し、 R_a はH原子、CN基、NO₂基、ハロゲン原子、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基またはC₃F₇基であり、 k は化学式中に示した範囲から選ばれた整数であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【0036】

【化54】

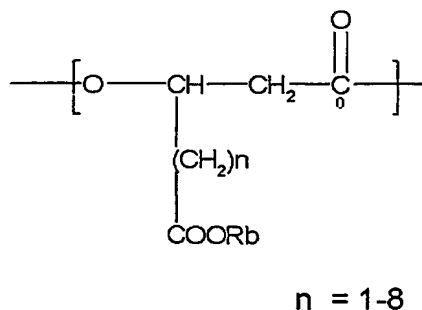


(6)

(n は化学式中に示した範囲内から選ばれた整数であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【0037】

【化55】



(7)

(n は化学式中に示した範囲内から選ばれた整数である； R_b は、H原子、Na原子またはK原子である；複数のユニットが存在する場合、 n および R_b は、ユニット毎に異なってもよい。)

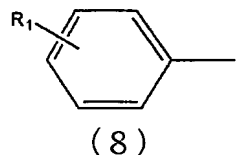
【0038】

また、本発明は、化学式(4)における R_z 、即ちフェニル構造或いはチエニ

ル構造のいずれかの構造を有する残基が、化学式(8)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)のいずれかであり、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表すポリヒドロキシアルカノエート共重合体とすることができる。

【0039】

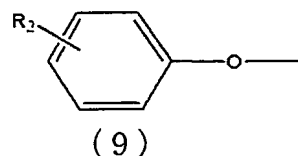
【化56】



(式中、 R_1 は芳香環への置換基を示し、 R_1 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR'$ (R' : H、Na、Kのいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $CH=CH_2$ 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【0040】

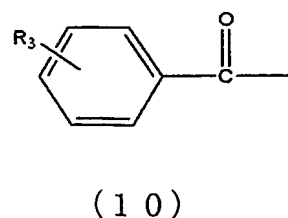
【化57】



(式中、 R_2 は芳香環への置換基を示し、 R_2 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 SCH_3 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【0041】

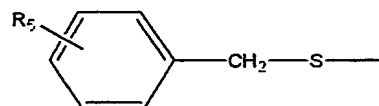
【化58】



(式中、 R_3 は芳香環への置換基を示し、 R_3 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【0042】

【化59】

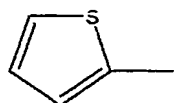


(11)

(式中、 R_5 は芳香環への置換基を示し、 R_5 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR'$ 、 SO_2R'' (R' : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【0043】

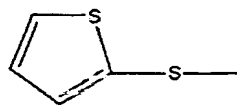
【化60】



(12)

【0044】

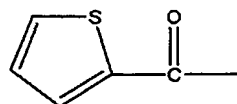
【化61】



(13)

【0045】

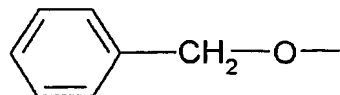
【化62】



(14)

【0046】

【化63】



(15)

【0047】

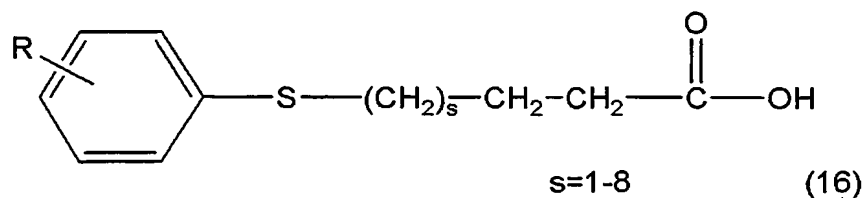
なお、本発明のポリヒドロキシアルカノエート共重合体は、数平均分子量が1000から1000000の範囲であるポリヒドロキシアルカノエート共重合体とすることができる。

【0048】

また、本発明は、化学式(16)で示す ω -（置換フェニルスルファニル）アルカン酸の少なくとも1種、及び、化学式(17)で示す化合物の少なくとも1種、化学式(18)で示す ω -シクロヘキシルアルカン酸の少なくとも1種、もしくは、化学式(19)で示す ω -アルケン酸の少なくとも1種、を原料として、化学式(3)に示す3-ヒドロキシー（置換フェニルスルファニル）アルカン酸ユニットを少なくとも分子中に含み、かつ、化学式(20)に示すユニット、化学式(5)に示す3-ヒドロキシー ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニット、もしくは、化学式(6)に示す3-ヒドロキシー ω -アルケン酸ユニットの少なくとも1種を前記分子中に同時に含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体を生産する能力を有する微生物により生合成せしめることを特徴とする、化学式(3)に示す3-ヒドロキシー（置換フェニルスルファニル）アルカン酸ユニットを少なくとも分子中に含み、かつ、化学式(20)に示すユニット、化学式(5)に示す3-ヒドロキシー ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニット、もしくは、化学式(6)に示す3-ヒドロキシー ω -アルケン酸ユニットの少なくとも1種を分子中に同時に含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法である。

【0049】

【化 6 4】

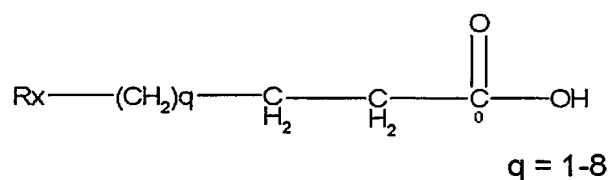


【0050】

(式中、Rは芳香環への置換基を示し、RはH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR'、SO₂R'' (R' : H、Na、K、CH₃、C₂H₅のいずれかを表し、R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい；また、sは、1～8から選ばれた整数であり、ユニット毎に違う値をとり得る。)

【0051】

【化 6 5】

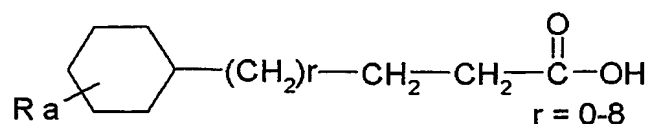


(17)

(qは化学式中に示した範囲内から選ばれた整数である；Rxはフェニル構造、或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)

【0052】

【化 6 6】



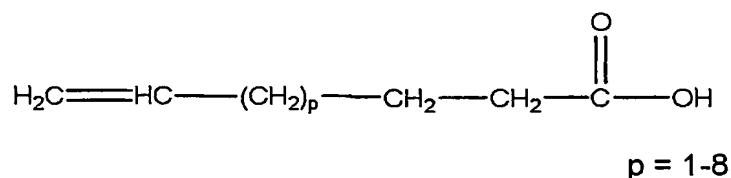
(18)

(式中、Raはシクロヘキシル基への置換基を示し、RaはH原子、CN基、N

O₂基、ハロゲン原子、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基またはC₃F₇基であり、rは化学式中に示した範囲内から選ばれた整数である)

【0053】

【化67】

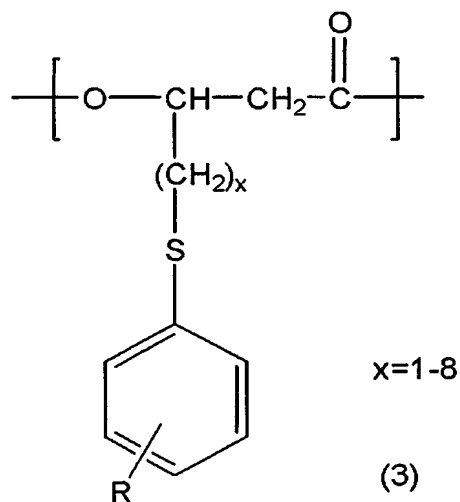


(19)

(pは化学式中に示した範囲内から選ばれた整数である)

【0054】

【化68】

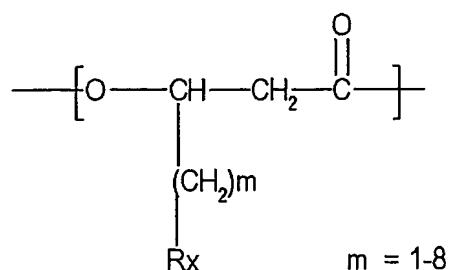


【0055】

(式中、Rは芳香環への置換基を示し、RはH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR'、SO₂R'' (R' : H、Na、K、CH₃、C₂H₅のいずれかを表し、R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい；xは、1～8から選ばれた整数であり、ユニット毎に違う値をとり得る。)

【0056】

【化69】

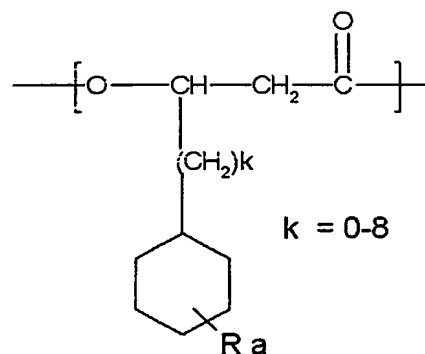


(20)

(m は化学式中に示した範囲内から選ばれた整数である； R_x はフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる；複数のユニットが存在する場合、 m および R_x は、ユニット毎に異なってもよい。)

【0057】

【化70】

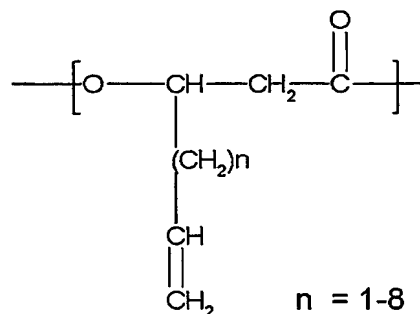


(5)

(式中、 R_a はシクロヘキシル基への置換基を示し、 R_a はH原子、CN基、NO₂基、ハロゲン原子、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基またはC₃F₇基であり、 k は化学式中に示した範囲から選ばれた整数であり、複数のユニットが存在する場合、 R_a 及び k は、ユニット毎に異なってもよい。)

【0058】

【化 7 1】



(6)

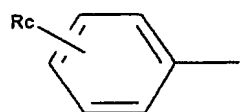
(nは化学式中に示した範囲内から選ばれた整数であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【0059】

更に、本発明においては、化学式(20)及び(17)におけるR_x、即ちフェニル構造、チエニル構造を有する残基が、化学式(21)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)のいずれかで示される残基の少なくとも1種である、ポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法とすることができる。

【0060】

【化 7 2】

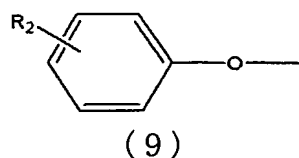


(21)

(式中、R_cは芳香環への置換基を示し、R_cはH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CH=CH₂基、CF₃基、C₂F₅基またはC₃F₇基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【0061】

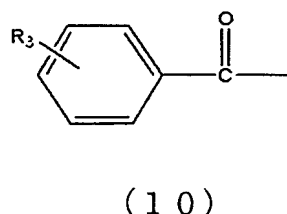
【化 7 3】



(式中、 R_2 は芳香環への置換基を示し、 R_2 は H 原子、ハロゲン原子、CN 基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 SCH_3 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【0062】

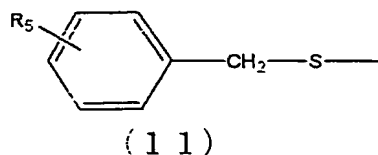
【化 7 4】



(式中、 R_3 は芳香環への置換基を示し、 R_3 は H 原子、ハロゲン原子、CN 基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【0063】

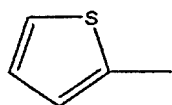
【化 7 5】



(式中、 R_5 は芳香環への置換基を示し、 R_5 は H 原子、ハロゲン原子、CN 基、 NO_2 基、 $COOR'$ 、 SO_2R'' (R' : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に異なってもよい。)

【0064】

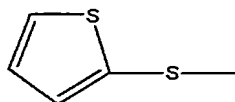
【化76】



(12)

【0065】

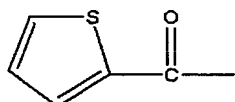
【化77】



(13)

【0066】

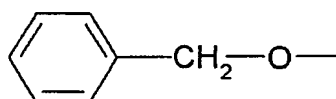
【化78】



(14)

【0067】

【化79】



(15)

【0068】

更に、本発明のポリヒドロキシアлкаノエート共重合体の製造方法は、前記化学式(16)で示す ω -（置換フェニルスルファニル）アルカン酸の少なくとも1種を含み、かつ、化学式(17)で示す化合物の少なくとも1種、もしくは化学式(18)で示す ω -シクロヘキシルアルカン酸の少なくとも1種、もしくは化学式(19)で示す ω -アルケン酸の少なくとも1種とを含む培地中で前記微生物を培養するポリヒドロキシアлкаノエート共重合体の製造方法とすることができる。

【0069】

更に詳細には、本発明のポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法は、前記化学式(16)で示す ω -(置換フェニルスルファニル)アルカン酸の少なくとも1種を含み、かつ、化学式(17)で示す化合物の少なくとも1種、化学式(18)で示す ω -シクロヘキシルアルカン酸の少なくとも1種、もしくは、化学式(19)で示す ω -アルケン酸の少なくとも1種に加えて、ペプチド類、酵母エキス、有機酸或いはその塩、アミノ酸或いはその塩、糖類、炭素数4から12の直鎖アルカン酸或いはその塩のうちの少なくとも1種を含む培地中で、前記微生物を培養するポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法とすることができ、

更に、本発明のポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法は、前記微生物の培養において、培地中に含有されるペプチド類がポリペプトンであり、また、培地中に含有される有機酸或いはその塩が、ピルビン酸、オキサロ酢酸、クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸、あるいはこれらの塩からなる群より選択される1つ以上の化合物であり、また、培地中に含有されるアミノ酸或いはその塩が、グルタミン酸、アスパラギン酸、或いはこれらの塩からなる群より選択される1つ以上の化合物であり、また、培地中に含有される糖類として、グリセロアルデヒド、エリトロース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、グリセロール、エリトリトール、キシリトール、グルコン酸、グルクロン酸、ガラクトン酸、マルトース、スクロース、ラクトースからなる群より選択される1つ以上の化合物であるポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法とすることができる。

【0070】

本発明のポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法における微生物の培養条件の詳細は、以下のとおりである。

【0071】

微生物の通常の培養、例えば、保存菌株の作製、ポリヒドロキシアルカノエート共重合体の生産に必要とされる菌数や活性状態を確保するための増殖などには、用いる微生物の増殖に必要な成分を含有する培地を適宜選択して用いる。例え

ば、微生物の生育や生存に悪影響を及ぼすものでない限り、一般的な天然培地（肉汁培地、酵母エキスなど）や、栄養源を添加した合成培地など、いかなる種類の培地をも用いることができる。温度、通気、攪拌などの培養条件は、用いる微生物に応じて適宜選択する。

【0072】

例えば、リン酸緩衝液及びアンモニウム塩或いは硝酸塩を基本とした無機塩培地に、以下に示すように種々の必要基質及び栄養素を加える。

【0073】

目的とするポリヒドロキシアлкаノエートを生産するための基質として前記化学式（16）で示す ω -（置換フェニルスルファニル）アルカ、及び前記化学式（17）で示す化合物もしくは前記化学式（18）で示す ω -シクロヘキシルアルカン酸もしくは化学式（19）で示す ω -アルケン酸を培地あたりそれぞれ0.01%から1%（w/v）、更に好ましくは0.02%から0.2%の割合で含有していることが望ましい。

【0074】

微生物増殖のための炭素源及び窒素源、ポリヒドロキシアлкаノエート生産のためのエネルギー供給源として加える上記の共存基質濃度は、通常培地あたり0.1%から5%（w/v）、更に好ましくは0.2%から2%の割合で含有していることが望ましい。

【0075】

本発明で用いる培地としては、リン酸塩及びアンモニウム塩或いは硝酸塩等の窒素源を含む無機塩培地ならいかなる培地でも良いが、窒素源の濃度を調節することでポリヒドロキシアлкаノエート共重合体の生産性を向上せしめることが可能である。

【0076】

培養温度としては上記の菌株が良好に増殖可能な温度であれば良く、15℃から37℃、更に好ましくは20℃から30℃程度が適当である。

【0077】

培養は液体培養、固体培養等該微生物が増殖し、ポリヒドロキシアлкаノエー

ト共重合体を生産する培養方法ならいかなる培養方法でも用いることができる。更に、バッチ培養、フェドバッチ培養、半連続培養、連続培養等の種類も問わない。液体バッチ培養の形態としては、振とうフラスコによって振とうさせて酸素を供給する方法、ジャーファーメンターによる攪拌通気方式の酸素供給方法がある。

【0078】

微生物にポリヒドロキシアルカノエート共重合体を生産・蓄積せしめる方法としては、上に示した方法の他に、一旦十分に増殖させて後に、塩化アンモニウムのような窒素源を制限した培地へ菌体を移し、目的ユニットの基質となる化合物を加えた状態で更に培養すると生産性が向上する場合がある。

【0079】

更に本発明の製造方法においては、上記のような条件下で前記微生物を培養し、前記微生物が産生した前記化学式(3)に示す3-ヒドロキシー(置換フェニルスルファニル)アルカン酸ユニットを少なくとも分子中に含み、かつ、化学式(20)に示すユニットもしくは化学式(5)に示す3-ヒドロキシー ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニットもしくは化学式(6)に示す3-ヒドロキシー ω -アルケン酸ユニットとを少なくとも分子中に同時に含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体を微生物細胞から回収する工程を有するポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法とすることができる。

【0080】

微生物細胞から目的のPHAを回収する方法としては、通常行なわれている方法を適用することができる。例えば、クロロホルム、ジクロロメタン、アセトンなどの有機溶媒による抽出が最も簡便ではあるが、それ以外にジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリルが用いられる場合もある。また、有機溶媒が使用しない環境中においては、SDS等の界面活性剤による処理、リゾチーム等の酵素による処理、次亜塩素酸塩、アンモニア、EDTA等の薬剤による処理、或いは超音波破碎法、ホモジナイザー法、圧力破碎法、ビーズ衝撃法、摩砕法、搗潰法、凍結融解法のいずれかの方法を用いて微生物細胞を物理的に破碎することによって、PHA以外の菌体成分を除去して、PHAを回収する方法を用いる

こともできる。

【0081】

本発明の製造方法で用いる前記微生物としては、前記条件を満たす能力を有する微生物であれば如何なる微生物でも良いが、その中でも特にシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物が望ましく、更に詳しくはシュードモナス チコリアイ (*Pseudomonas cichorii*)、シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescense*)、シュードモナス オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*)、シュードモナス アルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス スツツツェリ (*Pseudomonas stutzeri*)、シュードモナス ジェッセニイ (*Pseudomonas jesseni*) 等が望ましい。更に詳しくは、シュードモナス チコリアイ YN2 株 (*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM BP-7375)、シュードモナス チコリアイ H45 株 (*Pseudomonas cichorii* H45、FERM BP-7374)、シュードモナス ジェッセニイ P161 株 (*Pseudomonas jessenii* P161、FERM BP-7376) が挙げられる。これら3種の微生物は独立行政法人 産業技術総合研究所 (旧 通商産業省 工業技術院) 生命工学工業技術研究所 特許微生物寄託センターに寄託されており、特願平11-371863号に記載されている微生物である。

【0082】

培養方法に用いる無機培地としては、リン源 (例えば、リン酸塩など)、窒素源 (例えば、アンモニウム塩、硝酸塩など) 等、微生物の増殖に必要な成分を含んでいる培地であればいかなるものでも良く、例えば、MSB培地、M9培地等を挙げることができる。

【0083】

例えば、本発明の一方法に用いた無機塩培地 (M9培地) の組成を以下に示す。

【0084】

(M9培地)

 Na_2HPO_4 : 6.3 KH_2PO_4 : 3.0 NH_4Cl : 1.0 NaCl : 0.5 g/L、pH=7.0

【0085】

更に、良好な増殖及びPHAの生産のためには、上記の無機塩培地に以下に示す微量成分溶液を0.3% (v/v) 程度添加する必要がある。

【0086】

(微量成分溶液)

ニトリロ 三酢酸: 1.5; MgSO_4 : 3.0; MnSO_4 : 0.5; NaCl : 1.0; FeSO_4 : 0.1;

CaCl_2 : 0.1; CoCl_2 : 0.1; ZnSO_4 : 0.1; CuSO_4 : 0.1; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$: 0.1; H_3BO_3 : 0.1

Na_2MoO_4 : 0.1; NiCl_2 : 0.1 g/L

なお、本発明の微生物の培養、本発明の微生物によるPHAの生産と菌体への蓄積、並びに、本発明における菌体からのPHAの回収は、上記の方法に限定されるものではない。

【0087】

上記の製造方法により合成された、化学式(3)で示すユニットと化学式(20)で示すユニットもしくは化学式(6)で示すユニットとを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体は、この化学式(3)で示される、側鎖末端にフェニルスルファニル基または置換フェニルスルファニル基として、スルファニル基(—S—)を有するユニットの硫黄部分、スルファニル基(—S—)を選択的に酸化することで製造することができ、化学式(1)で示すユニットあるいは化学式(2)で示すユニットの少なくとも1種を含み、更には化学式(3)で示すユニットとを含むこともあるポリヒドロキシアルカノエート共重合体が得られる。

【0088】

このような酸化処理については、例えば、過酸化化合物を利用することができ、本発明の目的、すなわち、フェニルスルファニル基または置換フェニルスルファニル基として存在するスルファニル基（-S-）の酸化に寄与し得るものであれば、いかなる種類の過酸化化合物をも用いることが可能である。その際、酸化効率、ポリヒドロキシアルカノエート共重合体主鎖骨格への影響、処理の簡便さ等を考慮した場合、特に、過酸化水素、過炭酸ナトリウム、メタクロロ過安息香酸、過蟻酸、過酢酸からなる群から選択される過酸化化合物を用いることが好ましい。

【0089】

まず、その中でも処理方法が容易な過酸化水素を利用する処理について述べる。最も簡便な過酸化水素による処理方法は、前記の培養条件で微生物を培養し、本発明のポリヒドロキシアルカノエート共重合体の前駆体である、化学式（3）で示されるユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体を蓄積した微生物細胞をそのまま過酸化水素水に懸濁し、場合によっては一定時間加熱、攪拌して菌体の処理を行った後、不溶成分として、目的とするポリヒドロキシアルカノエート共重合体を回収する方法である。過酸化水素の濃度が比較的高い場合、または、反応温度が比較的高い場合には、菌体細胞由来の不溶成分、例えば、細胞膜などは、酸化を受けて、分解・可溶化され、本発明のポリヒドロキシアルカノエート共重合体のみが、不溶成分としてほぼ純粋な形で回収される。一方、温和な条件の場合には、分解・可溶化が十分に果たされず、一部菌体細胞由来の生体細胞を破碎する工程が残留する場合がある。

【0090】

このような温和な条件を利用する際には、予め培養微生物細胞を破碎し、菌体細胞由来の不溶成分を除去して、本発明のポリヒドロキシアルカノエート共重合体の前駆体である、化学式（3）で示されるユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体を粗製で回収した後に、過酸化水素水で処理する方法を採用することも可能である。この予め培養微生物細胞を破碎し、中間原料（前駆体）のポリヒドロキシアルカノエート共重合体を分離・回収する工程を設ける方法をとると、比較的温和な条件で、過酸化水素水による処理を行う際にも、十分に純

度の高いポリヒドロキシアルカノエート共重合体が回収される。

【0091】

本発明のポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法において、前記の生体細胞を破碎する工程では、超音波破碎法、ホモジナイザー法、圧力破碎法、ビーズ衝撃法、摩碎法、搗潰法（ガラス粉末やアルミナ粉末等の助剤を加えて乳鉢中ですり潰す方法）、凍結融解法など、細胞膜の破碎に薬剤を使用しない手段を用いることが好ましい。生体細胞を破碎する工程後、更に、分離した不溶成分の再懸濁液を遠心分離等の方法により固体成分と可溶成分とを分離し、中間原料となるポリヒドロキシアルカノエート共重合体成分が含まれている固体成分のみを過酸化水素で処理する。

【0092】

更に、もう一つのポリヒドロキシアルカノエート共重合体の分離方法としては、培養工程の後、ポリヒドロキシアルカノエート共重合体蓄積微生物細胞から、クロロホルム、ジクロロメタンやアセトンといった蓄積ポリヒドロキシアルカノエート共重合体の可溶溶媒によりポリヒドロキシアルカノエート共重合体のみを抽出・単離する手段を利用することもできる。抽出・単離した後、得られたポリヒドロキシアルカノエート共重合体のみを過酸化水素により処理する方法である。この溶媒抽出を利用する方法においては、微生物細胞から抽出・回収される前駆体ポリヒドロキシアルカノエート共重合体は、過酸化水素処理を行う水系媒体中で塊状になりやすい。前駆体ポリヒドロキシアルカノエート共重合体が塊状となった場合、過酸化水素などの過酸化化合物との接触の妨げとなり、場合によっては、この酸化反応の効率を著しく低下させることもあるなど、操作上の困難さ・煩雑さを伴う場合が多い。その観点からは、先に述べた2つの方法は、前駆体ポリヒドロキシアルカノエート共重合体は、本来、微生物細胞中に微粒子状で存在しており、その状態のまま、微粒子状の前駆体ポリヒドロキシアルカノエート共重合体を水懸濁状態で過酸化水素処理を施すことが可能であることから、操作上もより簡便な方法である。

【0093】

本発明のポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法で、酸化剤として

利用する過酸化水素は、本発明の目的、すなわち、フェニルスルファニル基または置換フェニルスルファニル基として存在するスルファニル基（-S-）の酸化を行える限り、いかなる形態のものをも用いることが可能である。なお、製造工程の制御という観点からは、その濃度などが、安定した性状の過酸化水素の溶液、例えば、過酸化水素水など、水系溶媒中に溶解したものをを用いることが望ましい。一例として、工業的に多量に安定生産可能な、J I S K-8230に則った過酸化水素水は推奨されるべきものであり、例えば、三菱瓦斯化学（株）製過酸化水素水（31%過酸化水素含有）は、本発明の方法において、好適な過酸化水素の溶液である。

【0094】

本発明のポリヒドロキシアлкаノエート共重合体の製造方法において、この過酸化水素を用いる酸化処理の条件は、処理されるポリヒドロキシアлкаノエート共重合体の状態（菌体成分の有無、塊状か微粒子状か等）により異なるが、概ね以下の範囲に選択することが好ましい。一般に、菌体成分の残存量が少ない場合、また、前駆体ポリヒドロキシアлкаノエート共重合体形状が微粒子状である場合には、不要な菌体成分の酸化・可溶化が容易に行え、あるいは、微粒子状のポリヒドロキシアлкаノエート共重合体自体では、より速やかな処理がなされるので、温和な条件を用いることができる。前記、J I S K-8230 規格品の過酸化水素水（31%過酸化水素含有）を利用する際、その希釈条件（濃度）、使用量、処理温度、時間などは、下記する範囲に選択することができる。

【0095】

処理液中の酸化水素濃度：反応温度にもよるが、8%（約4倍希釈）～31%（原液）、より好ましい濃度範囲としては、16%（約2倍希釈）～31%（原液）
反応量：前駆体ポリヒドロキシアлкаノエート共重合体中に含まれる化学式（3）のユニットの比率にも依存するものの、処理前ポリヒドロキシアлкаノエート共重合体1gに対して、原液過酸化水素水（31%過酸化水素含有）換算で30mL～500mL、より好ましい反応量は、100mL～300mLの範囲である。
反応温度：処理液中の濃度にもよるが、30℃～100℃、より好ましい温度としては、80℃～100℃の範囲に選択する。反応時間については、

その反応温度にもよるが、10分～180分、より好ましい時間としては、30分～120分の範囲である。

【0096】

前記する条件の範囲で、過酸化水素処理を施すことにより、微生物菌体に蓄積されていた、化学式(3)で示されるユニットを含む前駆体ポリヒドロキシアルカノエート共重合体から、化学式(1)ならびに化学式(2)で示されるユニットのうち、少なくとも1種をポリマー分子中に含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体、あるいは、化学式(1)ならびに化学式(2)で示されるユニットに加えて、中間原料のポリヒドロキシアルカノエート共重合体に由来する化学式(3)で表されるユニットをなお残すポリヒドロキシアルカノエート共重合体へと変換できる。その場合、過酸化水素処理の反応条件を選択して、酸化の進行速度、反応量を制御することにより、前記三種の各ユニットの存在比を制御することが可能となる。

【0097】

次に、過酸化化合物として、メタクロロ過安息香酸(MCPBA)を用いる方法について述べる。

【0098】

MCPBAを用いると、フェニルスルファニル基または置換フェニルスルファニル基として存在するスルファニル基(—S—)の酸化は、化学量論的に進行するため、化学式(1)ならびに化学式(2)で示されるユニットの含有比率の制御がし易い。また、その反応条件が温和であるため、ポリヒドロキシアルカノエート共重合体主鎖骨格の切断や活性部位の架橋反応等、不要な副次反応が起こり難い。従って、本発明のポリヒドロキシアルカノエート共重合体の製造方法において、高い選択性で目的とするポリヒドロキシアルカノエート共重合体を製造する上では、メタクロロ過安息香酸(MCPBA)は、非常に好適な過酸化化合物の一つである。

【0099】

一般的な反応条件として、スルファニル基(—S—)をスルフィニル基(—SO—)まで選択的に酸化するためには、中間原料のポリヒドロキシアルカノエー

ト共重合体（前駆体）中のスルファニル基（ $-S-$ ）を含むユニットモル量、1モルに対して、MCPBAを若干過剰量、具体的には、1.1～1.4モル量の範囲に選択し、クロロホルム中、温度を 0°C ～ 30°C の範囲に選択して、反応せしめる。前記の反応条件範囲においては、反応時間を10時間程度とすると、理論値のほぼ90%、20時間程度とすると、理論値のほぼ100%まで、酸化を進行させることができる。

【0100】

また、スルファニル基（ $-S-$ ）を全てスルホニル基（ $-SO_2-$ ）まで酸化するためには、中間原料のポリヒドロキシアルカノエート共重合体（前駆体）中のスルファニル基（ $-S-$ ）を含むユニットモル量、1モルに対して、MCPBAを2モルより若干過剰量、具体的には、2.1～2.4モル量の範囲に選択し、前記と同様の溶媒、温度、時間条件を選択して、反応を行えばよい。

【0101】

本発明の方法により製造される、微生物産生のポリヒドロキシアルカノエート共重合体を中間原料とする、ポリヒドロキシアルカノエート共重合体ポリマーには、スルフィニル構造（ $-SO-$ ）及びスルホニル構造（ $-SO_2-$ ）のうち、少なくとも一方を有するユニットが、そのポリマー分子中に含まれている。これらの構造は、かかるユニット末端における、分子中の電子の局在化を強力に促し、その電気的な性質は、従来のポリヒドロキシアルカノエート共重合体と比べ著しく異なっている可能性がある。また、このような電子の局在化により、溶媒に対する挙動も、従来のポリヒドロキシアルカノエート共重合体と異なるものとなる。一例を挙げると、ジメチルホルムアミド（DMF）のような極性溶媒にも溶解可能となる。また、熱的特性の制御、特にはガラス転移温度の上昇が顕著であり、広範な用途への応用が可能となる。

【0102】

また、化学式（20）に示す構造の1つであるビニルフェニル基もしくは化学式（6）で示される末端ビニル基における炭素-炭素二重結合部分についても酸化剤を用いて開裂することで、化学式（4）で示す構造の1つであるカルボキシフェニル基を有するユニットもしくは化学式（7）で示すユニットとを含むポリ

ヒドロキシアルカノエート共重合体を得られる。このように、炭素-炭素の二重結合を酸化剤を用いて、酸化開裂してカルボン酸を得る方法としては、

例えば、過マンガン酸塩を用いる方法 (J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 1, 806 (1973))、重クロム酸塩を用いる方法 (Org. Synth., 4, 698 (1963))、過ヨウ素酸塩を用いる方法 (J. Org. Chem., 46, 19 (1981)) 硝酸を用いる方法 (特開昭59-190945号広報)、オゾンを用いる方法 (J. Am. Chem. Soc., 81, 4273 (1959)) 等が知られており、更には、ポリヒドロキシアルカノエートに関しては、前述の *Macromolecular chemistry*, 4, 289-293 (2001) に、ポリヒドロキシアルカノエートの側鎖末端の炭素-炭素二重結合を酸化剤として過マンガン酸カリウムを用い、反応を酸性条件下で行うことで、カルボン酸を得る方法が報告されている。本発明においても同様の方法を用いることができる。

【0103】

酸化剤として用いる前記過マンガン酸塩としては、過マンガン酸カリウムが一般的である。過マンガン酸塩の使用量は、酸化開裂反応が化学量論的反応であるため、化学式(20)で示す構造の1つであるビニルフェニル基を含むユニットもしくは化学式(6)で示すユニット1モルに対して、通常1モル当量以上、好ましくは、2~4モル当量使用するのがよい。

【0104】

反応系を酸性条件下にするためには通常、硫酸、塩酸、酢酸、硝酸などの各種の無機酸や有機酸が用いられる。しかしながら、硫酸、硝酸、塩酸などの酸を用いた場合、ポリヒドロキシアルカノエートの主鎖のエステル結合が切断され、分子量低下を引き起こす恐れがある。そのため酢酸を用いることが好ましい。酸の使用量は、化学式(20)で示す構造の1つであるビニルフェニル基を含むユニットもしくは化学式(6)で示すユニット1モルに対して、通常、0.2~200モル当量、好ましくは0.4~100モル当量の範囲で用いられる。0.2モル当量に満たない場合には低収率となり、200モル当量を越える場合には酸による分解物が副生するため、いずれの場合も好ましくない。また、反応を促進す

る目的でクラウンエーテルを用いることができる。この場合、クラウンエーテルと過マンガン酸塩とは、錯体を形成し、反応活性が増大する効果が得られる。クラウンエーテルとしては、ジベンゾー 18-クラウン-6-エーテル、ジシクロー 18-クラウン-6-エーテル、18-クラウン-6-エーテルが一般的に用いられる。クラウンエーテルの使用量は、過マンガン塩 1 モルに対して、通常 1.0～2.0 モル当量、好ましくは、1.0～1.5 モル当量の範囲で用いることが望ましい。

【0105】

また、本発明の酸化開裂反応における溶媒としては、反応に不活性な溶媒であれば特に限定されず、たとえば、水、アセトン；テトラヒドロフラン、ジオキサン等のエーテル類；ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類；ヘキサン、ヘプタン等の脂肪族炭化水素類；メチルクロリド、ジクロロメタン、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類等を使用できる。これらの溶媒のなかでも、ポリヒドロキシアルカノエートの溶解性を考慮すれば、メチルクロリド、ジクロロメタン、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類が好ましい。

【0106】

本発明の前記酸化（開裂）反応において、化学式（3）で示すユニットと化学式（20）で示すユニットもしくは化学式（5）で示すユニットもしくは化学式（6）で示すユニットとを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体と、過マンガン酸塩及び酸は一括して最初から溶媒とともに仕込んで反応させてもよく、それぞれを連続的若しくは断続的に系内に加えながら反応させてもよい。また、過マンガン酸塩のみを先に溶媒に溶解若しくは懸濁させておき続いて、ポリヒドロキシアルカノエート共重合体及び酸を連続的若しくは断続的に系内に加えて反応させてもよく、ポリヒドロキシアルカノエート共重合体のみを先に溶媒に溶解若しくは懸濁させておき、続いて過マンガン酸塩及び酸を連続的若しくは断続的に系内に加えて反応させてもよい。更には、ポリヒドロキシアルカノエート共重合体及び酸を先に仕込んでおき続いて過マンガン酸塩を連続的若しくは断続的に系内に加えて反応させてもよく、過マンガン酸塩及び酸を先に仕込んでおき続いてポリヒドロキシアルカノエート共重合体を連続的若しくは断続的に系内に加え

て反応させてもよく、ポリヒドロキシアлкаノエート共重合体及び過マンガン酸塩を先に仕込んでおき続いて酸を連続的若しくは断続的に系内に加えて反応させてもよい。

【0107】

反応温度は、通常 $-20\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $0\sim 30^{\circ}\text{C}$ とするのがよい。反応時間は、化学式(16)で示すユニットと過マンガン酸塩の量論比及び反応温度に依存するが、通常2～48時間とするのがよい。

【0108】

化学式(20)に示す構造の1つであるビニルフェニル基もしくは化学式(6)で示される末端ビニル基における炭素-炭素二重結合部分の酸化剤処理により、化学式(3)で示されるユニットを含む前駆体ポリヒドロキシアлкаノエート共重合体から、化学式(1)ならびに化学式(2)で示されるユニットのうち、少なくとも1種をポリマー分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエート共重合体、あるいは、化学式(1)ならびに化学式(2)で示されるユニットに加えて、中間原料のポリヒドロキシアлкаノエート共重合体に由来する化学式(3)で表されるユニットをなお残すポリヒドロキシアлкаノエート共重合体への同時変換が可能である。

【0109】

以下に、実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明にかかる最良の実施形態の一例ではあるものの、本発明は、これら実施例の形態によって、限定されるものではない。

【0110】

(実施例1)

ポリペプトン(日本製薬株式会社製)0.5%、5-(フェニルスルファニル)吉草酸0.1%、5-フェニル吉草酸1.0mMを含むM9培地を、500ml容の振盪フラスコ8本に200mlずつ入れて高温高圧殺菌して冷却した後、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、 30°C 、125ストローク/分で振盪培養した。44時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して真空乾燥した。

【0111】

この乾燥菌体ペレットをクロロホルム 100 ml に懸濁し、35℃で16時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45 μ mのメンブラン・フィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。この濃縮液を冷メタノール中に加えて、PHAを再沈澱させ、沈澱物のみを回収し真空乾燥した。得られたPHAを秤量した結果、929 mgであった。

【0112】

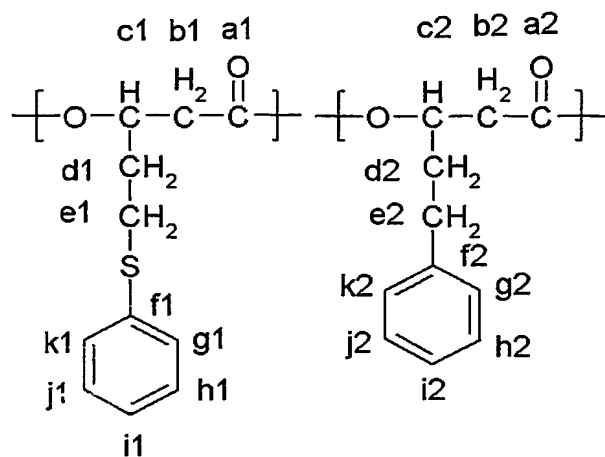
得られたPHAの平均分子量は、ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー (GPC; 東ソーHLC-8220、カラム; 東ソー TSK-GEL Super HM-H、溶媒; クロロホルム、ポリスチレン換算) により評価した。その結果、数平均分子量 $M_n = 141200$ 、重量平均分子量 $M_w = 393800$ であった。

【0113】

得られたポリマーの構造決定を、 ^1H -NMR (FT-NMR: Bruker DPX 400; ^1H 共鳴周波数: 400 MHz; 測定核種: ^1H ; 使用溶媒: CDCl_3 ; reference: キャピラリ封入TMS/ CDCl_3 ; 測定温度: 室温) によって行った。その ^1H -NMRスペクトルを図1に、また同定結果を表1に示す。その結果、3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル) 吉草酸 73 mol%、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 21 mol%、その他 (炭素数4~12の直鎖3-ヒドロキシアルカン酸及び炭素数10若しくは12の3-ヒドロキシアルカー5-エン酸) 合計 6 mol%を含む化学式Aに示すポリヒドロキシアルカノエート共重合体であることが確認された。

【0114】

【化 80】



(A)

【0115】

【表 1】

Chemical shift (ppm)	分裂	同定結果
1. 33	b r	d 1, d 2
2. 39 ~ 2. 57	m	b 1, b 2, e 2
2. 78 ~ 2. 88	m	e 1
5. 18 ~ 5. 27	m	c 1, c 2
7. 13	m	i 1, g 2, i 2, k 2
7. 24	m	g 1, h 1, j 1, k 1, h 2, j 2

【0116】

(実施例 2)

モノマーユニットとして、3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル) 吉草酸 73 mol %、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 21 mol %、その他 (炭素数 4 ~ 12 の直鎖 3-ヒドロキシアルカン酸及び炭素数 10 若しくは 12 の 3-ヒドロキシアルカー 5-エン酸) 合計 6 mol % を含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体 851 mg を 300 ml 容ナスフラスコ中に加え、ジクロ

ロメタン 60 ml を加えて溶解した。これを氷浴下に置き、酢酸 9 ml、18-クラウン-6-エーテル 2537 mg を加えて攪拌した。次に氷浴下で過マンガン酸カリウム 2020 mg をゆっくり加えて、室温で 20 時間攪拌した。反応終了後、水 50 ml 及び亜硫酸水素ナトリウム 6030 mg を加えた。その後、1.0 N 塩酸により液性を pH 1 にした。混合溶液中のジクロロメタンをエバポレーターにより留去した後、溶液中のポリマーを回収した。これをメタノール 100 ml で洗浄し、更に純水 100 ml で 3 回洗浄した後、ポリマーを回収した。減圧乾燥することで目的とする PHA を 1137 mg 得た。

【0117】

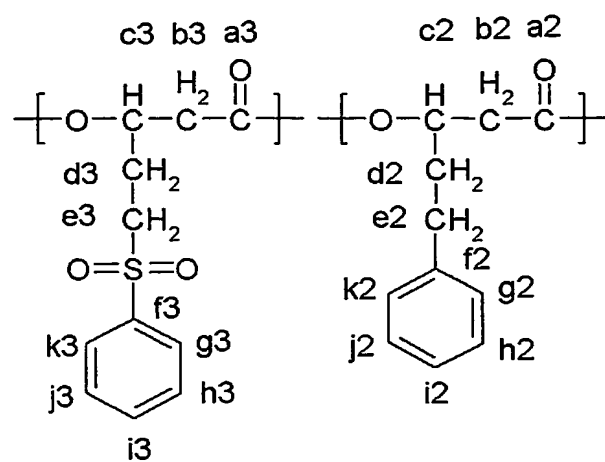
得られた PHA の平均分子量は、ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー (GPC; 東ソー HLC-8220、カラム; 東ソー TSK-GEL Super HM-H、溶媒; クロロホルム、ポリスチレン換算) により評価した。その結果、数平均分子量 $M_n = 42800$ 、重量平均分子量 $M_w = 112200$ であった。

【0118】

得られた PHA の構造を特定するため、 ^1H -NMR (FT-NMR: Bruker DPX400; ^1H 共鳴周波数: 400 MHz; 測定核種: ^1H ; 使用溶媒: CDCl_3 ; reference: キャピラリー封入 TMS/ CDCl_3 ; 測定温度: 室温) によって行った。その ^1H -NMR スペクトルを図 2 に、また同定結果を表 2 に示す。その結果、3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルホニル)吉草酸 71 mol%、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 23 mol%、その他 (炭素数 4~12 の直鎖 3-ヒドロキシアルカン酸及び炭素数 10 若しくは 12 の 3-ヒドロキシアルカー 5-エン酸) 合計 6 mol% を含む化学式 B に示すポリヒドロキシアルカノエート共重合体であることが確認された。

【0119】

【化 8 1】



【0 1 2 0】

【表 2】

Chemical shift (ppm)	分裂	同定結果
1. 8 8	b r	d 2
2. 0 0	b r	d 3
2. 5 4	b r	b 2, e 2, b 3
3. 1 5	b r	e 3
5. 1 8	b r	c 2, c 3
7. 1 3	m	g 2, i 2, k 2
7. 2 4	m	h 2, j 2
7. 5 1	b r	h 3, j 3
7. 5 8	m	i 3
7. 8 6	m	g 3, k 3

【0 1 2 1】

【発明の効果】

本発明により、側鎖末端にフェニルスルファニル及び／あるいはフェニルスル

フィニル構造を有するモノマーユニットと側鎖にフェニル構造、チエニル構造、シクロヘキシル構造といった直鎖アルキル基以外の置換基を有するモノマーユニットあるいはビニル基及び／あるいはカルボキシ基を有するモノマーユニットを導入したポリヒドロキシアルカノエート共重合体とその製造方法が提供される。

【0122】

本発明により、ポリヒドロキシアルカノエート共重合体の熱的特性の向上と溶媒への溶解性の制御が可能となり、本発明は、産業上、多大な貢献をなすものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の実施例1で製造されたポリヒドロキシアルカノエート共重合体の ^1H -NMRスペクトルチャートを示す。

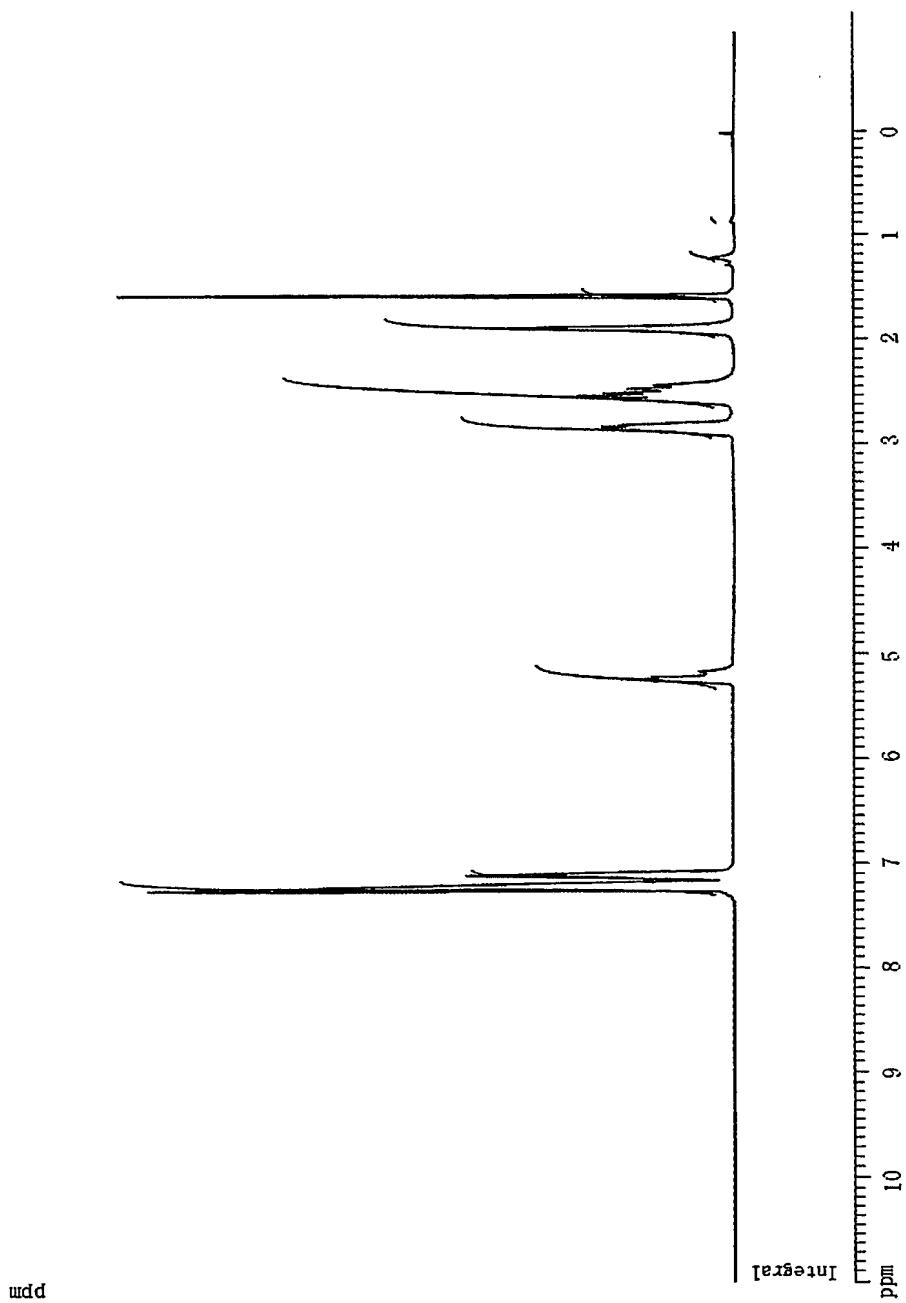
【図2】

本発明の実施例2で製造されたポリヒドロキシアルカノエート共重合体の ^1H -NMRスペクトルチャートを示す。

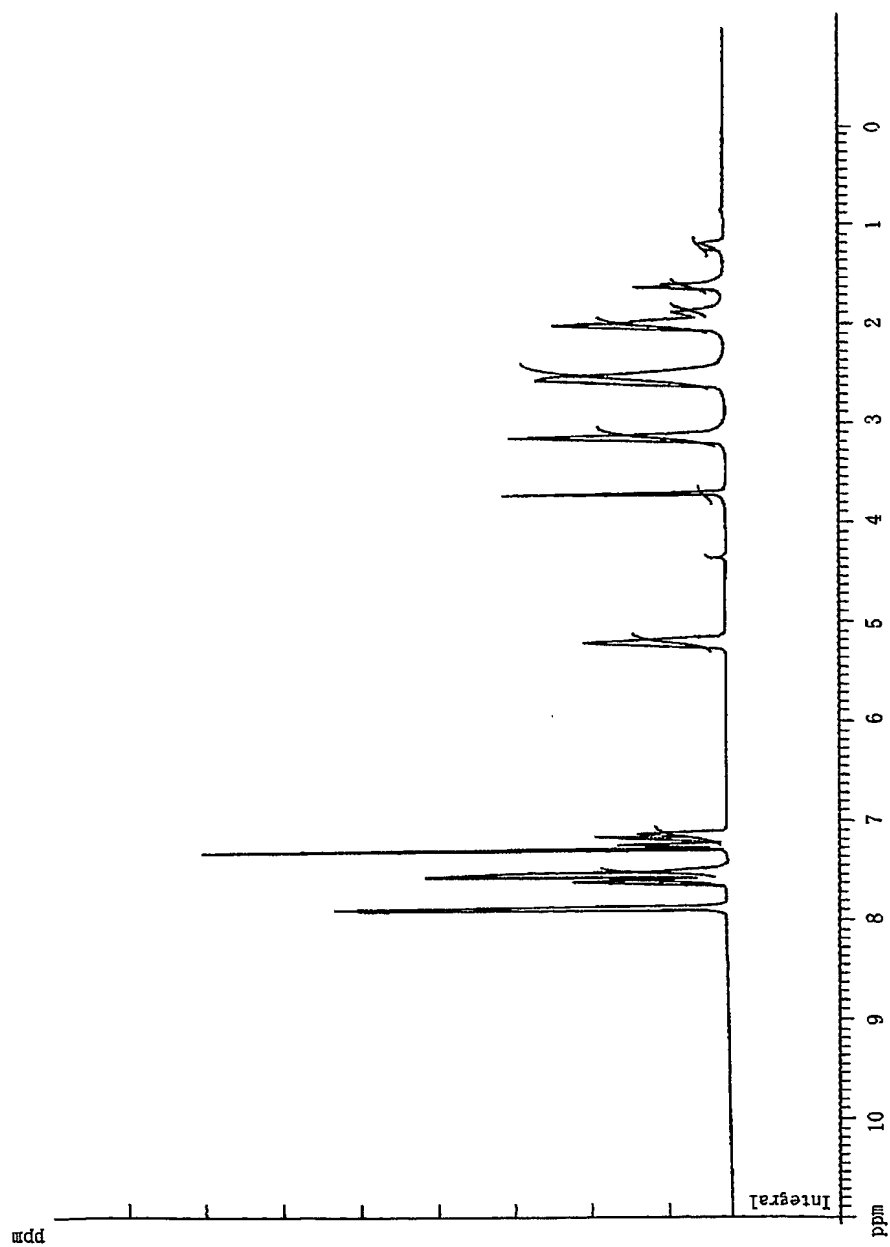
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 PHAのモノマーユニット比を任意に制御でき、更にポリマーとしての応用が制限されないように物性、特には熱的特性、溶媒への溶解性を任意に制御し得るようなPHA及びその製造方法を提供する。

【解決手段】 化学式(1)に示す3-ヒドロキシー(置換フェニルスルフィニル)アルカン酸ユニット、あるいは、化学式(2)に示す3-ヒドロキシー(置換フェニルスルホニル)アルカン酸ユニットのうち、少なくとも1種のユニットをポリマー分子中に含み、

かつ、前記分子中に、化学式(4)に示すユニット、化学式(5)に示す3-ヒドロキシー ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニット、化学式(6)に示す3-ヒドロキシー ω -アルケン酸ユニット、或いは、化学式(7)に示す3-ヒドロキシー ω -カルボキシアリカン酸ユニットのうち少なくとも1種を同時に含むことを特徴とするポリヒドロキシアリカノエート共重合体。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 3 0 9 7 8 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 0 0 7]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 3 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号

氏 名

キャノン株式会社